

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES
IMUNOFENOTÍPICOS EM PLAQUETAS DE DOADORES DO BANCO DE SANGUE
DO HOSPITAL DE CLINICAS DE PORTO ALEGRE**

Daiane Keller Cecconello

Porto Alegre, dezembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES
IMUNOFENOTÍPICOS EM PLAQUETAS DE DOADORES DO BANCO DE SANGUE
DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

Trabalho apresentado como
requisito parcial para aprovação na
Disciplina de Trabalho de
Conclusão do Curso de Farmácia
da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Daiane Keller Cecconello

Professor Orientador: Diogo André Pilger

Co-orientador: Mariela Granero Farias

Porto Alegre, dezembro de 2015.

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Anexo I) na qualidade de “Artigo Original”. A versão em língua inglesa será elaborada após as correções e sugestões da banca revisora.

Determinação do perfil de expressão dos marcadores imunofenotípicos em plaquetas de doadores de sangue do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Daiane Keller Cecconello^{1,2}, Mariela Granero Farias², Priscila Aparecida Correa Freitas², Ana Paula Alegretti², Diogo André Pilger¹

¹Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Unidade de Diagnóstico Personalizado (Citometria de Fluxo), Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Autor correspondente:

Prof. Dr. Diogo André Pilger

Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Avenida Ipiranga, 2752, sala 304E, Porto Alegre, RS, Brasil. CEP 90.610-000

E-mail: diogo.pilger@ufrgs.br

Resumo

Introdução: Através da Imunofenotipagem por Citometria de fluxo, os diferentes antígenos plaquetários podem ser identificados com o uso de anticorpos monoclonais específicos. Dentre as várias glicoproteínas específicas de membrana associadas às plaquetas destacam-se a GPIIb(CD41a), GPIX(CD42a), GPIb(CD42b), e GPIIIa(CD61). Diversas patologias associadas à disfunção plaquetária podem ser identificadas através da avaliação da expressão de diferentes marcadores imunofenotípicos, entretanto, pouco se sabe sobre os níveis normais de expressão destes marcadores na população sadia.

Objetivo: Determinar o perfil de expressão dos marcadores imunofenotípicos associados às plaquetas, por técnica Citometria de fluxo em indivíduos saudáveis.

Metodologia: Foi avaliada a expressão dos marcadores plaquetários de 30 amostras de doadores voluntários do banco de sangue através da análise imunofenotípica seguindo um painel específico (CD41, CD42a, CD42b e CD61). As amostras foram analisadas no Citômetro de Fluxo FACSCanto™ II (Becton, Dickinson, San Jose, CA). Para análise das Intensidades médias de fluorescência (IMF) foi utilizado o *software* Infinicyt™ (Cytognos SL, Salamanca, Spain). Após a implantação da técnica foram analisados três pacientes com suspeitas de Bernard Soulier para a validação da detecção de deficiência destes marcadores.

Resultados: A IMF dos marcadores CD41, CD42a, CD42b e CD61 nas plaquetas foram de $83,53 \pm 15,44$, $75,33 \pm 10,79$, $155,18 \pm 23,81$ e $44,92 \pm 8,32$, respectivamente. Foi possível correlacionar os resultados com os valores dos pacientes com disfunção plaquetária, sugerindo que dois eram de fato portadores de Bernard Soulier.

Conclusão: Este estudo permitiu realizar a padronização da técnica de marcação plaquetária, evidenciando uma heterogeneidade na IMF de antígenos plaquetários em indivíduos saudáveis. Foi possível auxiliar no diagnóstico de dois pacientes com disfunções plaquetárias e excluir uma suspeita. Estes achados demonstram a importância de conhecer a expressão destes marcadores em um grupo controle, possibilitando futuros estudos para aplicação em pacientes com disfunções plaquetárias.

Palavras-chave: plaquetas; imunofenotipagem; citometria de fluxo; glicoproteínas;

Introdução

As plaquetas derivam, juntamente com os eritrócitos, da linhagem mieloide. São células anucleadas produzidas a partir da fragmentação do citoplasma de megacariócitos, encontrados na medula óssea.^{1,2} Seu papel é essencial na hemostasia, formando um tampão mecânico, além de apresentar outras funções importantes como a manutenção do tônus vascular. No processo hemostático, participa na migração para a matriz subendotelial sempre que ocorre dano vascular e liberação de fator tissular (FT).^{3,4} Quando ativadas, as plaquetas expressam rapidamente glicoproteínas (GP) de superfície que permitem as reações de adesão e agregação que formam o tampão plaquetário, através de interações específicas entre as plaquetas, endotélio vascular, células inflamatórias e matriz extracelular.³

As plaquetas apresentam diversos receptores de adesão, entre eles o complexo glicoprotéico GPIb-IX-V e GpVI, que permite sua ligação, respectivamente, ao fator de von Willebrand (FvW) e ao colágeno subendotelial. O FvW funciona como uma superfície de ancoragem para as plaquetas, sua ligação com GPIb/V/IX induz a secreção de ADP. Assim, a GPIb-V-IX é a principal responsável pela adesão plaquetária ao subendotélio.^{3,5} Após a adesão, ocorre a ativação plaquetária, etapa na qual ocorre a interação entre receptores plaquetários e seus agonistas (especialmente a trombina) promovendo uma mudança conformacional das proteínas do citoesqueleto na membrana plaquetária, resultando em um aumento na expressão de moléculas de adesão superficiais via GPIIb/IIIa na plaqueta.⁵

As principais glicoproteínas presentes na superfície plaquetária, identificadas como essenciais para o funcionamento normal das plaquetas são o complexo GPIb/IX/V e o GPIIb/IIIa.^{5,6} Para sua caracterização, já foram identificados diferentes marcadores de membrana, entre eles CD41, CD42a, CD42b, CD51, CD61 e CD62.^{7,8} O antígeno CD41 refere-se à glicoproteína de membrana plaquetária GPIIb que está associada de modo não covalente com GPIIIa, a qual é reconhecida pelo marcador CD61, formando o complexo GPIIb-IIIa.^{9,10} Já o CD42a reconhece a GPIX e o CD42b interage com GPIb, as quais, como já citadas anteriormente, são essenciais no processo de adesão plaquetária.³

A citometria de fluxo é uma técnica de identificação e caracterização celular que permite a identificação simultânea de múltiplas características de uma única célula. É uma tecnologia na qual a análise inclui a marcação de células com anticorpos monoclonais ligados a agentes fluorescentes, o que a torna atualmente a técnica mais

precisa para detectar a expressão de moléculas de superfície em plaquetas.³ É uma ferramenta que proporciona de maneira objetiva, simples e rápida a determinação das características físicas, biológicas e químicas de células, apresentando confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados.^{3,4} As vantagens da utilização da técnica como ferramenta metodológica são inúmeras, incluindo avaliar individualmente a extensão da ativação plaquetária, detectar subpopulações de plaquetas e avaliar quantitativamente biomarcadores.⁴

Deficiências e anormalidades das glicoproteínas de membrana plaquetária levam aos quadros de síndromes hemorrágicas que apresentam variabilidade clínica. Entre as principais doenças associadas, destacam-se, por exemplo, a Síndrome de Bernard-Soulier e a Trombastenia de Glanzmann.²

A Síndrome de Bernard Soulier é uma doença autossômica recessiva cuja causa se deve a diversas alterações moleculares, produzindo proteínas alteradas que teriam um papel fundamental na estabilidade da expressão do complexo GPIb/IX, na qual se observa importante alteração da expressão na superfície da plaqueta, comprometendo sua eficácia funcional. Pode ser verificado através da redução da expressão dos anticorpos CD42a e CD42b.^{2,11} Já a Trombastenia de Glanzmann é uma trombocitopatia autossômica recessiva na maioria das vezes, que se caracteriza pela ausência de agregação plaquetária e discrasia hemorrágica crônica, causada pela deficiência ou diminuição da glicoproteína GPIIb-IIIa, consistindo em anormalidades qualitativas e quantitativas desse complexo, mas sem alteração de número, tamanho, forma e tempo de vida de plaquetas.² O uso dos anticorpos monoclonais CD41 e CD61 permite identificar com precisão a deficiência, uma vez que aparecem alterados. O tratamento utilizado para ambas as doenças é a transfusão de plaquetas, sendo a aloimunização plaquetária uma séria consequência desse procedimento.²

Considerando o universo de doenças associadas à disfunção plaquetária que podem ser identificadas através da avaliação da expressão de diferentes marcadores imunofenotípicos, torna-se necessário e fundamental, como primeiro passo no estudo, o estabelecimento destes parâmetros na população controle, já que pouco se sabe sobre os níveis normais de expressão destes marcadores na população sadia. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é determinar o perfil de expressão dos marcadores imunofenotípicos associados às plaquetas por técnica citometria de fluxo em pacientes sadios.

Materiais e Métodos

Amostra:

Foram avaliados 30 voluntários doadores do banco de sangue de um Hospital Universitário de Porto Alegre, no período de março a outubro de 2015, com idades entre 18 a 65 anos.

As amostras de sangue periférico foram coletadas para realização da análise imunofenotípica, sendo processadas em até duas horas após a punção venosa. Indivíduos que apresentaram resultados de hemoglobina acima de 11,5g/dL para sexo feminino e 12,5g/dL para sexo masculino, hematócrito acima de 37% para sexo feminino e 40% para sexo masculino e contagem de plaquetas entre 150.000 e 450.000/uL foram incluídos no estudo. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre registrado pelo número 966.585 e todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participar deste estudo.

Adicionalmente, com o objetivo de avaliar a aplicação diagnóstica dos valores anteriormente estabelecidos para o perfil de expressão imunofenotípica plaquetária da população saudável, foram analisados três pacientes com suspeita clínica de Síndrome de Bernard Soulier que tiveram solicitação do exame de imunofenotipagem no laboratório de Citometria de Fluxo do HCPA. Foi realizada uma análise demonstrativa sobre a densidade celular entre os voluntários saudáveis e os pacientes com suspeita de desordem plaquetária.

Citometria de fluxo:

O estudo de expressão dos antígenos plaquetários foi realizado conforme técnica padronizada e descrita a seguir. A amostra de sangue total coletada em K₂EDTA foi previamente homogeneizada para posterior transferência de 5 µL de seu volume para um tubo de ensaio contendo 50 µL de tampão PBS (tampão Fosfato Salino Laborclin). Foram adicionados a este tubo os anticorpos monoclonais com volumes previamente validados por titulação, sendo então incubados por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com 2,0 mL de PBS, homogeneizadas em vórtex e primeiramente centrifugadas a 900 g por 10 minutos para eliminação da fração leucocitária e, posteriormente, a 2800 g por 10 minutos para obtenção das plaquetas.

O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas com 500 µL PBS, sendo adquiridos 20000 eventos no gate de plaquetas no citômetro de fluxo FACSCanto™ II® (BD, São José, CA, EUA). Para análise dos dados foi utilizado o *software* Infinicyt (Cytognos SL, Salamanca, Espanha).

O painel de anticorpos monoclonais utilizado foi CD41 FITC (EXBIO, Clone MEM-06), CD42a FITC (BD, Clone ALMA16), CD42b PE (BD, Clone HIPI), CD61 PerCP (BD, Clone RUU-PI7F), CD45 APC (BC, Clone J33). A seleção dos antígenos a serem avaliados foi baseado nas recomendações da literatura.⁴ Como controle foi usado a população de células CD45 negativa (eritrócitos) da própria amostra estudada.

Para identificar a intensidade média de fluorescência (*MFI – median fluorescence intensity*) de uma molécula na população de plaquetas, foi utilizada a seguinte estratégia de *gates*: identificação da população de eritrócitos (controle negativo) nos parâmetros FSCxSSC; seleção da população CD45 negativa e marcadores plaquetários negativos. Após, foi realizada a identificação da população de plaquetas nos parâmetros FSCxSSC e na população CD45 negativa e realizada uma segunda análise que incluiu a população que expressa o antígeno de interesse de cada caso, de acordo com a SSC (complexidade) e o marcador plaquetário de interesse. A partir disto, se estimou o valor de IMF dentro dessas células que estão incluídas nessas duas análises, conforme a figura 1.

Análises estatísticas:

Foi realizada uma análise descritiva dos dados demográficos (idade, sexo, quantificação e tamanho de plaquetas) e laboratoriais dos indivíduos incluídos neste estudo de padronização. Para avaliar a normalidade da distribuição dos diferentes marcadores imunofenotípicos de plaquetas na amostra foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram apresentados em média \pm desvio-padrão e foi utilizado o *software Statistical Package for the Social Sciences®* (SPSS) versão 18.0 para análise considerando uma significância de 5%.

Resultados

Com o objetivo de estabelecer os valores médios de expressão dos marcadores plaquetários, foram analisados 30 voluntários doadores do banco de sangue, hematologicamente normais. A média de idade foi $34,26 \pm 12,09$ anos sendo 16 indivíduos do sexo masculino e 14 do sexo feminino.

A IMF dos marcadores expressos na população plaquetária utilizados para a caracterização imunofenotípica dos 30 indivíduos saudáveis estão apresentados na tabela 1. Os resultados foram avaliados através de histogramas onde expressaram os antígenos CD41, CD42a, CD42b e CD61, cuja intensidade de expressão corresponde ao pico da curva.

O nível de expressão para cada marcador de superfície plaquetária dos pacientes com suspeita de Bernard Soulier está descrito na tabela 2. Os histogramas apresentados na figura 2 relacionaram a densidade celular comparativa entre os pacientes saudáveis e os pacientes com suspeita de Bernard Soulier, onde se espera que seja possível auxiliar no diagnóstico correto das suspeitas patológicas.

Discussão

Foi determinado o perfil de expressão dos marcadores imunofenotípicos associados às plaquetas, pela técnica citometria de fluxo em população de indivíduos hematologicamente normais, tornando possível a incorporação do teste na investigação laboratorial e para auxiliar no estudo de diversas patologias associadas à disfunção plaquetária através da avaliação da expressão destes marcadores.

Foi avaliada a aplicação deste método na rotina laboratorial, combinando uma estratégia baseada em *gates* para detectar marcadores de superfície plaquetária conforme critérios sugeridos por Michelson *et al.*¹² Analisando-se os resultados obtidos, pode-se verificar que as expressões dos marcadores (CD42a, CD42b e CD41) na população controle obtiveram perfis análogos, estando de acordo com estudos prévios observados na literatura⁴ com exceção do antígeno CD61, que apresentou valores distintos, pois esperava-se que fosse encontrado expressão semelhante a literatura.

Conforme a literatura, os anticorpos monoclonais podem ser utilizados no ensaio para medir a expressão de qualquer antígeno de superfície plaquetária, permitindo a identificação da mesma.¹² Nesse trabalho, foi utilizado um painel dirigido contra o complexo GPIIb-IIIa, GPIb-IX-V, para investigar a expressão dos anticorpos

na superfície de plaquetas.¹³ A utilização de GPIIb-IIIa (CD41 e CD61) e GPIb-IX (CD42a e CD42b) em painéis favorece a identificação de plaquetas e a caracterização das mesmas na forma em repouso e ativada.^{9,14}

É de grande importância a utilização do complexo GPIb-IX-V visto que este é responsável pela adesão plaquetária através da sua interação com o Fator de von Willebrand ao subendotélio exposto. É composto por quatro subunidades, a GPIba (CD42b), GPIb β (CD42c), GPIX (CD42a) e GPV (CD42d).^{12,13} A ausência de uma dessas subunidades diminui a expressão de superfície do complexo inteiro.¹³

Segundo Freitas *et al*, 2012 sabe-se que contrariamente aos anticorpos que, de modo geral, têm maior afinidade pelos receptores quando as plaquetas estão ativadas, o CD42a apresenta maior afinidade por plaquetas no estado inativo³ o que pode ser comprovado na diferença de valores com o anticorpo CD42b, pois ele se liga à membrana de plaquetas em repouso e ativadas. Após a ativação plaquetária, ocorre uma diminuição da expressão do complexo GP Ib/IX/V na superfície. Desta forma, o CD42b permite o estudo de deficiências de glicoproteínas, reações metabólicas responsáveis por mudanças na superfície das plaquetas, adesão plaquetária e a identificação de plaquetas no sangue periférico e de megacariócitos.¹⁵

Neste estudo, utilizamos apenas anticorpos voltados para a identificação plaquetária, pois nosso objetivo foi avaliar a intensidade de expressão dos mesmos. Como citado anteriormente, a GPIIIa é uma glicoproteína transmembrana, integrina β 3, expressa em plaquetas que associa-se à GPIIb para formar o complexo GPIIb-IIIa, que tem o papel de mediador da agregação entre as plaquetas ativadas.^{3,15} Os anticorpos CD41 e CD61, que reconhecem os epítomos GpIIb e GpIIIa, respectivamente, ligam-se à membrana das plaquetas em repouso e das plaquetas ativadas, sendo que a intensidade de expressão destas glicoproteínas aumenta com a ativação.^{15,16}

No presente estudo, o CD61 expressou valores divergentes do CD41 nos indivíduos saudáveis, visto que deveriam apresentar valores semelhantes uma vez que ambos reconhecem o mesmo complexo glicoprotéico e deveriam ser equivalentes.¹² Esses resultados foram atribuídos à fluorescência do anticorpo utilizado, sugerindo-se a utilização de anticorpos com outras fluorescências para posteriores testes, recomendando sempre se testar um controle junto com o paciente suspeito mostrando a importância de controlar os clones, as intensidades que podem diminuir com o tempo de uso e marcação utilizada. Cumpre ressaltar que a interação

anticorpo-GPIIb-IIIa pode ser afetada *in vitro* pela manipulação da amostra ou, mais comumente, pelo uso de fixadores e inibidores plaquetários.³

A citometria de fluxo já tem sido utilizada em diversas aplicações laboratoriais para este tipo celular, como controle de qualidade de concentrado de plaquetas, imunofenotipagem de receptores de superfície de plaquetas, reações cruzadas, disfunções plaquetárias e detecção de anticorpos anti-plaquetas feto-maternal.¹⁷ As aplicações podem incluir a monitorização da evolução clínica destas doenças, identificar pacientes que poderiam se beneficiar de terapia antiplaquetária adicional, monitorando os efeitos das intervenções terapêuticas, prevenindo complicações, ou a identificação de pacientes com risco de trombozes.¹⁸ A análise imunofenotípica é uma ferramenta importante e possui a vantagem de ter mínima manipulação do sangue total, promovendo resultados qualitativos.^{6,19}

No diagnóstico de deficiências hereditárias, a citometria de fluxo proporciona um meio rápido e simples para a identificação de deficiências glicoproteicas de membrana plaquetárias, como a síndrome de Bernard-Soulier e Trombastenia de Glanzmann.^{12,19} No caso de Bernard Soulier, ela permite a análise de plaquetas sem dificuldades técnicas de procedimento de separação das plaquetas gigantes, características da síndrome, das células vermelhas e leucócitos de tamanho similar.^{6,19,20}

Conforme citado anteriormente, a Síndrome de Bernard-Soulier se caracteriza por um distúrbio autossômico recessivo raro, onde se espera que os indivíduos heterozigotos sejam portadores assintomáticos.^{21,22} Na homozigose a tendência ao sangramento geralmente é evidente desde a infância precoce, mas a severidade dos sintomas pode variar durante a puberdade e a vida adulta.²² Ela é provocada por defeitos em qualquer um dos genes que codificam GPIb-IX-V, ocasionando a ausência ou diminuição de uma das proteínas do complexo na superfície plaquetária, geralmente GPIb.^{23,24} Isto torna a ligação do fator de Von Willebrand ao GP IB-IX-V defeituosa, resultando na redução da adesão de plaquetas ao subendotélio vascular lesado, levando a um aumento de sangramento moderado a grave, associada com macroplaquetas, baixa contagem de plaquetas, tempo de hemorragia prolongado e trombocitopenia moderada.^{23,24,25}

De acordo com a literatura, a citometria de fluxo possui um padrão clássico para a doença, apresentando níveis extremamente reduzidos de CD42a e CD42b, os quais são associados com a normalidade ou o aumento da expressão de CD41a e CD61.^{23,26} A expressão aumentada de GPIIb-IIIa, é devido ao fato das plaquetas serem

maiores do que as normais, portanto cada partícula pode transportar um número maior de receptores. Se especula que as plaquetas de pacientes com Síndrome de Bernard-Soulier podem compensar a falta de receptores GPIb-IX-V, aumentando a expressão de GP IIb-IIIa.^{11,25}

A partir do nosso estudo, foi possível analisar 3 pacientes com suspeita de Bernard Soulier. Fundamentalmente, observou-se que alguns tiveram padrões diferentes de expressão imunofenotípica. O paciente 1 expressou níveis normais de CD42a, CD42b e CD61, e expressão elevada de CD41 em relação aos controles, sugerindo então que esse paciente não é portador da doença. Isto foi confirmado junto aos prontuários do paciente no hospital em estudo, o qual indicou o diagnóstico de Anemia de Fanconi. No caso dos pacientes 2 e 3, os dados observados sugerem que eles sejam portadores de Bernard Solier, pelo fato de apresentarem baixa expressão de CD42a e CD42b, e CD61 ligeiramente aumentado. Esses valores implicam no diagnóstico, além do que, outros dados laboratoriais dos pacientes, como plaquetopenia e macroplaquetas corroboraram com o diagnóstico.²⁷

Um fator limitante encontrado para este estudo foi o baixo número de pacientes com suspeitas de desordens plaquetárias para comparar com os pacientes da padronização.

Conclusão

Este estudo permitiu realizar a padronização da técnica de marcação plaquetária por citometria de fluxo, evidenciando uma heterogeneidade na intensidade média de fluorescência de antígenos plaquetários em indivíduos sadios. Pode-se auxiliar o diagnostico de 2 pacientes com disfunções plaquetárias e excluir uma suspeita, de acordo com as expressões dos marcadores celulares estudados, demonstrando a aplicabilidade na prática clínica da incorporação do teste.

O método aplicado demonstrou que análise em plaquetas pode ser realizada por uma técnica simples e rápida e automatizada, apresentando confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Permitiu a detecção simultânea de antígenos de superfície de forma sensível e específica. Contudo, quando se trata de uma suspeita de alteração na intensidade de expressão e não apenas na ausência total do marcador, os clones e as fluorescências devem ser controladas e sempre devemos analisar uma amostra controle juntamente com o paciente em questão.

Estes resultados são importantes para se conhecer o perfil de intensidade destes marcadores em indivíduos saudáveis, possibilitando futuros estudos e aplicações em pacientes com distúrbios plaquetários, auxiliando em diagnósticos e contribuindo com a rotina laboratorial.

Referências Bibliográficas

1. Vasconcelos RC. Avaliação dos marcadores celulares por Citometria de Fluxo nos portadores de leucemia mieloide aguda atendidos no hemocentro do Rio Grande do Norte-Hemonorte [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2010. 121p.
2. Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. J Bras Patol Med Lab. 2006; 42(5):321-32.
3. Freitas LG. Inovações metodológicas em Hematologia Clínica: Uso da Citometria de Fluxo no estudo da ativação plaquetária na pré-eclâmpsia [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2012. 159 p.
4. Van Velzen JF, Laros-van Gorkom BAP, Pop GAM, Van Heerde WL. Multicolor flow cytometry for evaluation of platelet surface antigens and activation markers. Thromb Res. 2012; 130(1):92-8. ISSN 1879-2472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424855>>
5. Maciel PMP. Padronização da determinação da presença de óxido nítrico em plaquetas humanas por citometria de fluxo [Monografia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2013. 55p.
6. Michelson AD, Barnard MC, Krueger LA, Frelinger AL, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. Methods. 2000; 21(3):259-70. ISSN 1046-2023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10873480>>
7. Martins DM, Gagliani LH. Importância da citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das leucemias. UNILUS Ensino e Pesquisa. 2013; 5(8):5-24. ISSN 2318-2083.
8. Alves EB. Aspectos morfológicos e imunofenotípicos das leucemias mielóides agudas em pacientes do Amazonas [Dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2009. 68p.
9. Landi, EP, Marques JJF. Caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. Rev. bras. hematol. Hemoter. 2003; 25(1):39-46.
10. Garcia MTM, Cailleret M, Godin I, Nogueira MM. Expression of CD41 on hematopoietic progenitors derived from embryonic hematopoietic cells. Development. 2002; 129(8):2003-13.
11. Bunescu A, Lindahl TL, Solum NO, Schulmann S. Partial expression of GP Ib measured by flow cytometry in two patients with Bernard-Soulier syndrome. Thromb

Res. 1994; 76(5):441-50. ISSN 0049-3848. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7900092> >

12. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*. 1996; 87(12):4925-36. ISSN 0006-4971. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8652804> >

13. Hadjkacem B, Elleuch H, Gargouri J, Gargouri AF. Bernard–Soulier syndrome: novel nonsense mutation in GPIIb gene affecting GPIIb–IX complex expression. *Annals of hematology*. 2009; 88(5):465-472. ISSN 0939-5555.

14. Krajewski S, Kurz J, Wendel HP, Straub A. Flow cytometry analysis of porcine platelets: optimized methods for best results. *Platelets*. 2012; 23(5):386-94. ISSN 1369-1635. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22035358> >

15. Hortelao DGQ. Ativação plaquetária e outros fatores condicionantes da resposta à transfusão de plaquetas [Dissertação]. Porto: Universidade Católica Portuguesa; 2012. 91p.

16. Kozek-Langenecker SA, Mohammad FS, Fazal S, Masaki T. The effects of aprotonin on platelets in vitro using whole blood flow cytometry. *Anesth Analg*. Jan 2000; 90(1):12-6. ISSN 0003-2999. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10624968> >

17. Krueger LA, Barnard MR, Frelinger RAL, Furman MI, Michelson AD. Immunophenotypic Analysis of Platelets. *Current Protocols in Cytometry*. 2002;6(10):1-17.

18. Akrawinhawong K, Park JW, Piknova B, Sibmooh N, Fucharoen S. A flow cytometric analysis of the inhibition of platelet reactivity due to nitrite reduction by deoxygenated erythrocytes. *PLoS One*. 2014;9(3):e92435. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24642865> >

19. Fischer GB. Efeito da concentração e combinação de crioprotetores na viabilidade medida por citometria de fluxo das células tronco hematopoiéticas congeladas em freezer mecânico [Tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2014. 123p.

20. Karpus WJ. Improving flow cytometric methodology for blood cell functional analysis. *Cytometry A*. 2015; 87(1):21-2. ISSN 1552-4930. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25532453> >

21. Wright SD, Michaelides K, Johnson DJ, West NC. Double heterozygosity for mutations in the platelet glycoprotein IX gene in three siblings with Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 1993;81(9):2339-47. ISSN 0006-4971. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8481514> >

22. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagicparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:46. ISSN 1750-1172. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17109744> >

- 23.** Beltrame MP, Malvezzi M, Zanis J, Pasquini R. Flow cytometry as a tool in the diagnosis of Bernard-Soulier syndrome in Brazilian patients. *Platelets*. 2009;20(4):229-34. ISSN 1369-1635. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19459130>>
- 24.** Koskela S, Partanen J, Salmi TT, Kekomaki R. Molecular characterization of two mutations in platelet glycoprotein (GP) Ib alpha in two Finnish Bernard-Soulier syndrome families. *Eur J Haematol*. 1999; 62(3):160-8. ISSN 0902-4441. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089893>>
- 25.** Sumitha E, Jayandharan GR, David S, Jacob RR, Bargavi B. Molecular basis of Bernard-Soulier syndrome in 27 patients from India. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011; 9(8):1590-1598. ISSN 1538-7836.
- 26.** Pham A, Wang J. Bernard-Soulier syndrome: an inherited platelet disorder. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(12):1834-6. ISSN 1543-2165. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18081445>>
- 27.** Frigeni M, Galli M. Childhood myelodysplastic syndrome associated with an acquired Bernard-Soulier-like platelet dysfunction. *Blood*. 2014;124(16):2609. ISSN 1528-0020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25485346>>
- 28.** Lazarus AH, Wright JF, Blanchete V, Freedman J. Analysis of platelets by flow cytometry. *Transfus Sci*. 1995; 16(4):353-61. ISSN 0955-3886. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10159506>>
- 29.** Freedman J, Lazarus AH. Applications of flow cytometry in transfusion medicine. *Transfus Med Rev*. 1995; 9(2):87-109. ISSN 0887-7963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7795335>>
- 30.** Rondina MT, Grissom KC, Men S, Harris ES. Whole blood flow cytometry measurements of in vivo platelet activation in critically-ill patients are influenced by variability in blood sampling techniques. *Thromb Res*. 2012;129(6):729-35. ISSN 1879-2472. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22178064>>.

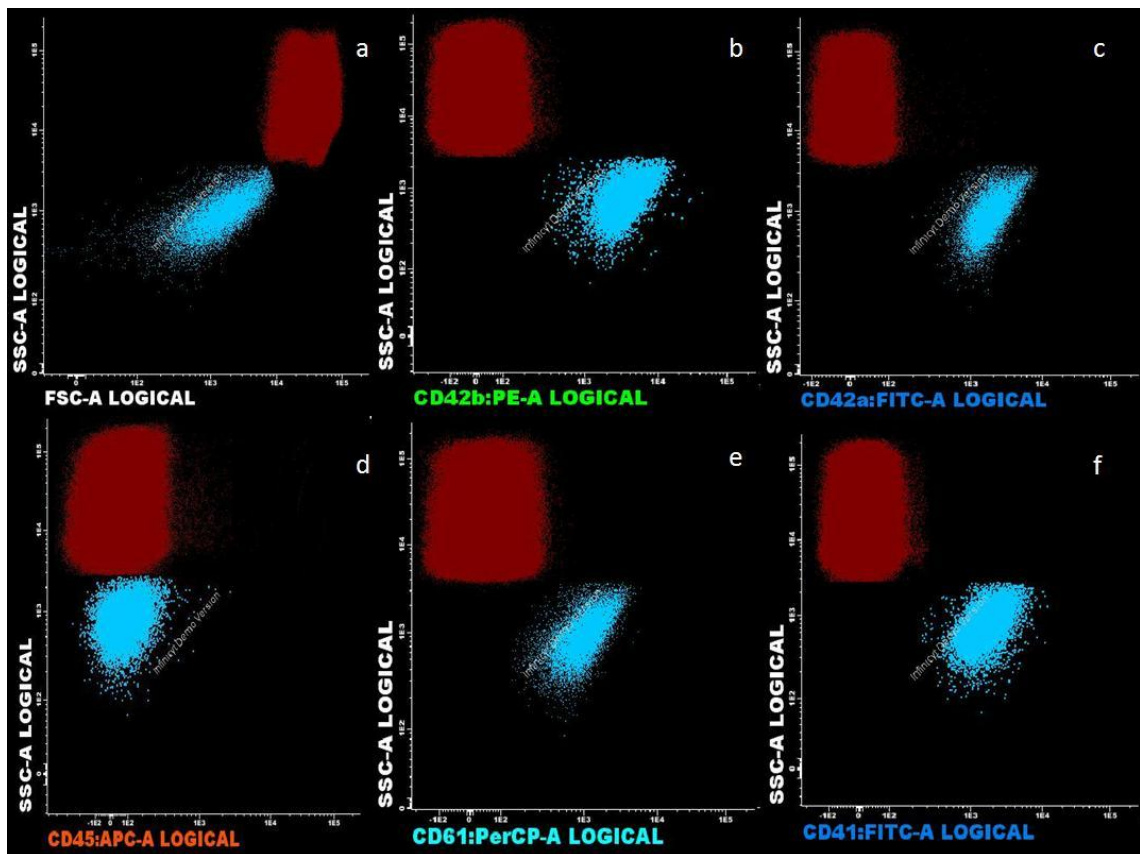


Figura 1: Representação da expressão dos marcadores CD42b (b), CD42a (c), CD61 (e) e CD41 (f) por Imunofenotipagem para identificação de plaquetas. Em azul está representado a população de plaquetas e, em vermelho, os eritrócitos utilizados como controle negativo. Utilizou-se o CD45 (d) para a identificação da população de plaquetas e eritrócitos pois sua expressão negativa indica a presença destas células.

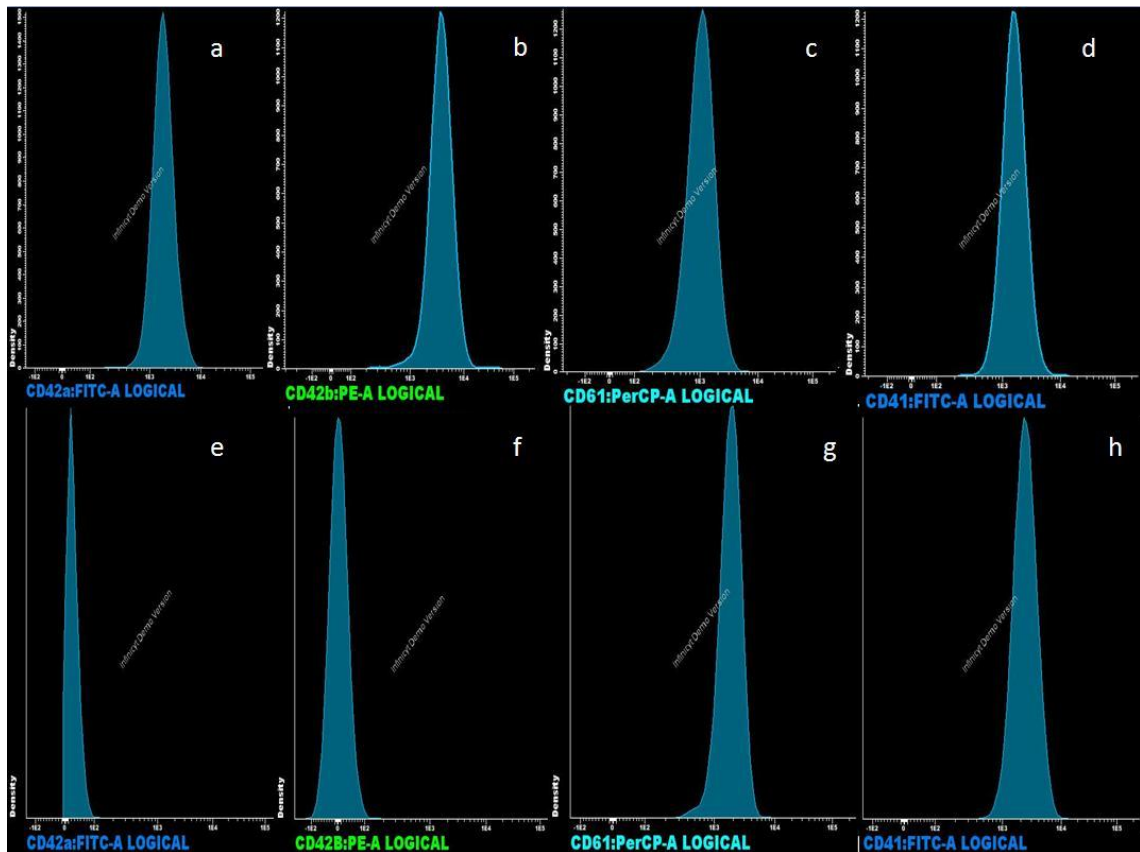


Figura 2: Histograma de antígenos plaquetários CD42a, CD42b, CD61 e CD41 em voluntários controle (a-d) e em pacientes com suspeita de Bernard Soulier (e-h). Observa-se que o paciente com suspeita de doença tem uma expressão baixa de CD42b e CD42a, uma expressão aberrante de CD61 e expressão dentro padrão de CD41.

Tabela I: Parâmetros plaquetários e IMF de antígenos em amostra de indivíduos saudáveis.

	<i>Nº de plaquetas</i>	<i>VPM</i>	<i>IMF</i>			
			<i>CD42a</i>	<i>CD42b</i>	<i>CD61</i>	<i>CD41</i>
n=30	280±30	8,8±0,2	75,33±10,79	155,18±23,81	44,92±8,32	83,53±15,44

Valores de IMF nos 30 voluntários utilizados para a padronização da técnica. Dados estão expressos como média ± DP.

VPM: Volume plaquetário médio.

IMF: Intensidade média de fluorescência.

Tabela II: Características dos pacientes com suspeita de disfunções plaquetárias.

	<i>Nº de plaquetas</i>	<i>VPM</i>	<i>IMF</i>			
	<i>(x 10⁹/µL)</i>	<i>(fL)</i>	<i>CD42a</i>	<i>CD42b</i>	<i>CD61</i>	<i>CD41</i>
Paciente 1	-	-	87,40	132,40	50,00	149,90
Paciente 2	120x10 ⁹ /µL	14,9fL	15,80	25,00	72,99	90,50
Paciente 3	17x10 ⁹ /µL	10,5	44,97	53,16	104,10	79,14

Os valores nas colunas acima correspondem à expressão dos antígenos de superfície celular estudados. Os dados estão expressos como mediana obtida no *Software Infinicyt*. Os dados de VPM e nº de plaquetas foram obtidos através dos prontuários dos pacientes.